

## 宮城県で発生したアカバネ病の発生時期による病理学的特徴とウイルス遺伝子検出部位の推移

高森広典<sup>1)†</sup> 日野正浩<sup>1)</sup> 高橋幸治<sup>1)</sup> 豊島たまき<sup>1)</sup> 竹田百合子<sup>1)</sup>  
高野泰司<sup>1)</sup> 田中省吾<sup>2)</sup> 山川 睦<sup>2)</sup>

- 1) 宮城県仙台家畜保健衛生所 (〒983-0832 仙台市宮城野区安養寺3-11-22)  
2) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所九州支所 (〒891-0105 鹿児島市中山町2702)

(2012年6月29日受付・2012年9月5日受理)

### 要 約

2010年東北地方にアカバネウイルス (AKAV) が流行し、アカバネ病と診断された異常産子牛60頭の病変の特徴と中枢神経系 (CNS) 組織におけるAKAV遺伝子検出部位の発生時期による推移について検討した。9～10月分娩の15症例では、脊椎彎曲及び非化膿性脳脊髄炎が14症例に認められた。11～12月分娩の22症例では、重度の矮小筋症が認められた。2011年2～4月分娩の12症例では、水無脳症が10症例に認められた。免疫組織化学的染色により、9月分娩の子牛1症例の頸髄グリア細胞にのみ、AKAV抗原がわずかに認められたが、ウイルス分離は、すべての症例で陰性であった。一方、AKAV遺伝子は、9～10月分娩の全症例から検出され、12月分娩の一部の症例でも中脳、延髄及び脊髄からは検出可能であった。2月以降分娩の症例では、いずれの部位からも遺伝子は検出されなかった。以上の結果から、AKAV遺伝子は、CNS病変が存在するかぎり、中脳、延髄及び脊髄から長期に渡って検出可能であることが示された。アカバネ病診断においては、これらの部位を中心に検査を進めていくことが重要である。

——キーワード：アカバネウイルス遺伝子、水無脳症、延髄、矮小筋症、脊髄。

----- 日獣会誌 66, 39～44 (2013)

アカバネウイルス (AKAV) は、ブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属に分類される節足動物媒介ウイルスの一種であり、妊娠牛に感染すると、流産、死産、早産及び関節彎曲症・水無脳症候群を伴った先天異常子の娩出といった異常産を引き起こすことがよく知られている [1, 2]。一方で、AKAVは、生後の若齢牛に感染し、非化膿性脳脊髄炎の原因となることも報告されている [3-5]。AKAVの国内分離株は、分子系統樹解析により、genogroup I と genogroup II の2つの遺伝子グループに大別される [6]。2006年南九州地方に流行し、生後感染を多数引き起こした株は前者に [3-5]、2008年に九州地方から北陸地方まで広域に流行し、胎子感染による典型的アカバネ病の発生の原因となった株は後者に属することが報告されている [7, 8]。

2010年東北地方の広範囲に渡ってAKAVが流行し、

宮城県内において11年ぶりにアカバネ病が発生した。今回、アカバネ病と診断された子牛の病態を分娩時期ごとに詳細に観察し、AKAV遺伝子検出部位の推移を調査したので報告する。

### 材料及び方法

**野外材料：**2010年9月24日から2011年6月2日まで当所に病性鑑定のために搬入された異常産子牛60頭について検索した。発生地域は県内全域であったが、特に県北西部からの搬入が半数で、黒毛和種41頭、ホルスタイン種14頭及び交雑種5頭であった。異常産子牛の母牛は、全頭ワクチン未接種であった。

**病理組織学的検査：**異常産子牛を剖検し、主要臓器を採材して10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。常法によりパラフィン包埋後、薄切した組織切片にHE染

† 連絡責任者：高森広典 (宮城県仙台家畜保健衛生所)

〒983-0832 仙台市宮城野区安養寺3-11-22

☎022-257-0921 FAX 022-295-0984

E-mail : takamori-hi742@pref.miyagi.jp



図1 3月分挽子牛 (No. 58) の水無脳症  
大脳半球の大半は欠損，菲薄化し，海馬・視床が露出する。

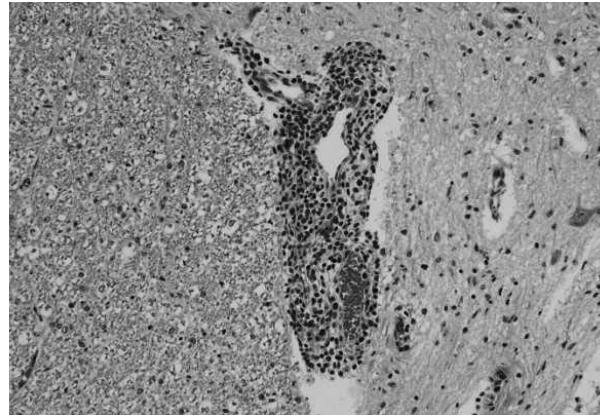


図2 9月分挽子牛 (No. 3) の頸髄に認められた非化膿性脳脊髄炎  
小型円形単核細胞による囲管性細胞浸潤が認められる (HE 染色 ×200)。

表1 アカバネ病と診断した子牛の臨床症状の推移

分娩時期	生時起立不能	虚弱・盲目	死産	計
9～10月	14*		1	15
11月	13		2	15
12月	5	1	1	7
1月	8	2	1	11
2月	2	5	1	8
3～4月	1	3		4
計	43	11	6	60

\*頭数

表2 アカバネ病と診断した子牛の剖検所見の推移

分娩時期	検査頭数	脊椎彎曲	前肢拘縮	後肢拘縮	脳室拡張	大脳欠損
9～10月	15	8(53)*	12(80)	10(67)	1(7)	0(0)
11月	15	2(13)	14(93)	14(93)	0(0)	0(0)
12月	7	1(14)	5(71)	5(71)	0(0)	0(0)
1月	11	0(0)	7(64)	7(64)	2(18)	0(0)
2月	8	0(0)	4(50)	4(50)	1(13)	6(75)
3～4月	4	0(0)	1(25)	1(25)	0(0)	4(100)

\*病変が確認された頭数 (%)

表3 アカバネ病と診断した子牛のCNS病変の推移

分娩時期	検査頭数	非化膿性脳脊髄炎											
		大脳・小脳				中脳・延髄				脊髄			
		-*	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
9～10月	15	8**	4	1	2	1	5	3	6	4	4	1	6
11月	15	12	3	0	0	10	2	2	1	8	6	0	1
12月	7	7	0	0	0	4	3	0	0	4	3	0	0
1月	11	11	0	0	0	10	1	0	0	10	1	0	0
2月	8	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0
3～4月	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0

\*病変の程度

- (著変なし)
- + (軽度)：軽度の囲管性細胞浸潤
- ++ (中等度)：軽度の囲管性細胞浸潤，軽度なグリア細胞の集簇
- +++ (重度)：著明な囲管性細胞浸潤，グリア結節

\*\*病変が確認された頭数

色を実施した。また，9～10月に分娩された6症例 (No. 1～6) の中枢神経系 (CNS) 組織切片には，抗AKAV家兎免疫血清 (動衛研より分与) を用いて市販キット (ヒストファイン，ニチレイ株，東京) によりSAB法で免疫組織化学的染色を実施した。

遺伝子検査及びウイルス分離：発症牛60頭中57頭の

CNS組織について，市販キット (QIAamp Viral RNA Mini kit, QIAGEN, U.S.A.) でRNAを抽出後，Akashiら [9] のプライマーを用いて市販キット (PrimeScript One Step RT-PCR kit ver. 2.0, タカラバイオ株，滋賀) によりRT-nested PCRを実施した。9～10月に分娩された搬入初期の症例及び抗体価が低値 (2～32倍)

表4 アカバネ病と診断した子牛の筋病変の推移

分娩時期	検査頭数	矮小筋症											
		頸部				前肢				後肢			
		-*	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
9~10月	15	2**	6	7	0	2	3	10	0	4	3	7	1
11月	15	2	7	5	1	0	2	12	1	0	3	11	1
12月	7	0	6	1	0	0	1	5	1	0	1	3	3
1月	11	1	5	5	0	0	3	7	1	0	4	6	1
2月	8	0	2	6	0	1	2	4	1	0	4	4	0
3~4月	4	1	3	0	0	1	3	0	0	2	2	0	0

## \*病変の程度

- (著変なし)

+ (軽度): 一部の筋線維が大小不同

++ (中等度): 約半数の筋線維が矮小化し, 筋線維間の一部は線維性組織及び脂肪組織に置換

+++ (重度): 大部分の筋線維が矮小化し, 筋線維間の大部分が線維性組織及び脂肪組織に置換

## \*\*病変が確認された頭数

を示した9症例 (No. 1~6, 11, 12, 14) については, 採材した延髄及び脊髄乳剤をハムスター肺由来株化 (Hmlu-1) 細胞に接種し, 34℃で回転培養を行い, 細胞変性効果 (CPE) の出現を指標に3代継代した。

**ウイルス遺伝子の分子系統樹解析:** 9月分娩子牛 (No. 3) の延髄及び脊髄から得られたPCR産物について塩基配列を決定し, S RNA分節のタンパク質コード領域 (699塩基) について, 遺伝子解析ソフトMEGA4を用いて, 近隣結合法にて既知の国内外分離株と比較し, 分子系統樹を作製した。

**抗体検査:** 異常産子牛60頭のうち, 採材可能であった54頭の血清について, Hmlu-1細胞を用いたマイクロタイター法によりAKAV OBE-1株に対する中和抗体価を測定した。また, 9~10月に分娩された6症例 (No. 1~6) については, 同様にアインウイルス (AINOV) JANAr28株及びチュウザンウイルス (CHUV) 31株に対する抗体検査も実施した。さらに, 県内の牛異常産関連疾病発生予察のため, 2010年6, 8, 9及び11月に未越夏おとり牛から得られた100頭延べ389血清検体について同様に抗体検査を実施した。

## 成 績

**臨床症状及び病理学的検査:** 剖検時の臨床症状は, 生時起立不能43頭, 盲目・虚弱11頭及び死産6頭であった。2010年9月~2011年1月分娩の子牛は, 生時起立不能を示す症例が83% (40/48) と多かったが, 2月以降は盲目・虚弱を呈す子牛が67% (8/12) と多く認められた (表1)。

脊椎彎曲は, 9~10月分娩の子牛に53% (8/15) と最も高率に認められた (表2)。前肢及び後肢拘縮は, 11月分娩の子牛に93% (14/15) と最も高率に認められたが, 3~4月分娩の子牛まで全期間を通じて確認された。大脳欠損は, 2月分娩の子牛に初めて確認され, 3

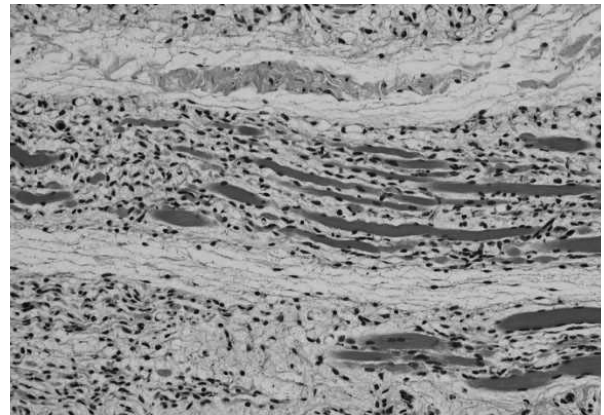


図3 9月分娩子牛 (No. 2) の右前肢骨格筋における矮小筋症 (HE染色 ×200)。

~4月分娩の子牛において全症例に認められた (表2, 図1)。

病理組織学的には, リンパ球を主体とする軽度の囲管性細胞浸潤やグリオーシスが9~10月分娩の子牛に93% (14/15) と最も高率に認められたが, 2月以降は認められなかった。これら非化膿性炎の程度は, 大脳及び小脳と比較して, 中脳, 延髄及び脊髄が重度であった (表3, 図2)。また, 頸部及び前・後肢骨格筋の矮小筋症が全期間を通じて認められたが, 3月分娩の子牛では軽度であった (表4, 図3)。

免疫組織化学的染色により, 比較的化膿性脳脊髄炎の病変が強かった9月分娩子牛 (No. 3) の頸髄グリア細胞内にのみ, AKAV抗原に対する陽性反応がわずかに認められた。

**遺伝子検出及びウイルス分離:** 表5に示したように, 9~10月分娩の子牛では, 全症例の延髄及び胸髄からAKAV遺伝子が検出されたが, 腰髄87% (13/15), 頸髄80% (12/15), 中脳60% (9/15), 小脳33% (5/15), 大脳13% (2/15) と各部位の検出率に差が認

表5 AKAV 遺伝子検出部位の推移

分娩時期	大脳	小脳	中脳	延髄	頸髄	胸髄	腰髄
9～10月	2/15 (13)*	5/15 (33)	9/15 (60)	15/15 (100)	12/15 (80)	15/15 (100)	13/15 (87)
11月	0/15 (0)	0/15 (0)	1/14 (7)	9/15 (60)	7/15 (50)	10/15 (67)	5/15 (36)
12月	0/2 (0)	0/2 (0)	1/7 (14)	3/7 (43)	1/7 (14)	3/7 (43)	2/7 (29)
1月	NT**	NT	NT	1/11 (9)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)
2月	NT	NT	NT	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)
3～4月	NT	NT	NT	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)

\* 遺伝子検出頭数/検査頭数 (%)

\*\*NT: Not tested

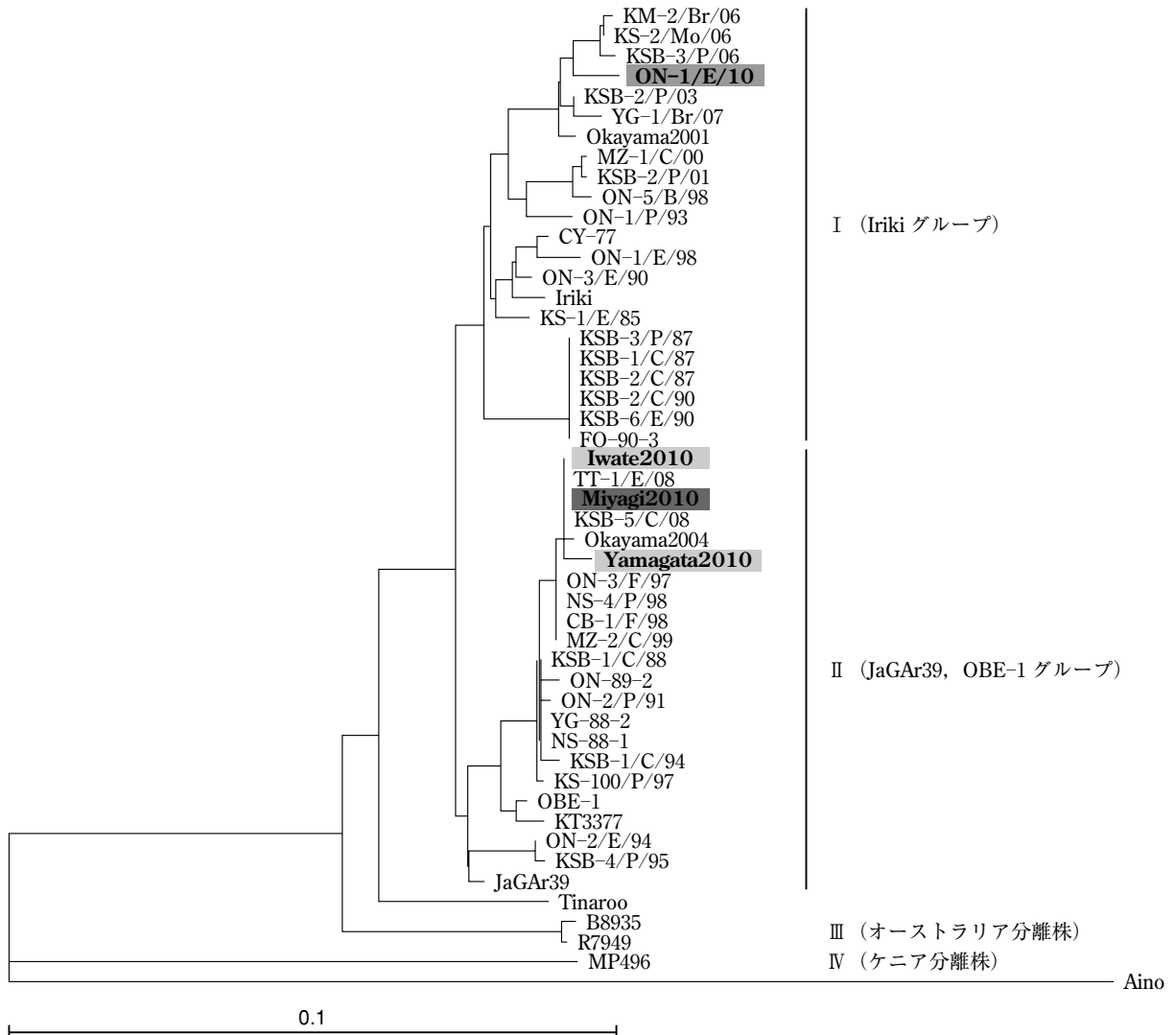


図4 AKAV S RNA 分節タンパク質コード領域 (699 塩基) の塩基配列に基づく分子系統樹  
網掛けは2010年流行株 (■:宮城 ■:岩手, 山形 ■:沖縄) を示す。

められた。11～12月分娩の子牛では、大脳及び小脳からは検出されず、延髄及び胸髄からの検出率が55% (12/22), 59% (13/22) と高かった。1月以降分娩の子牛では、1月初旬に分娩された1頭の延髄から検出されたのみであった。

一方、9～10月に分娩された9症例 (No. 1～6, 11, 12, 14) の延髄及び脊髄からは、ウイルスは分離されな

かった。

ウイルス遺伝子の分子系統樹解析：9月分娩子牛 (No. 3) から検出されたPCR産物の塩基配列を解析した結果、同年山形及び岩手県で流行した株とともに、ワクチンの原株であるOBE-1株と同じgenogroup IIに属し、2008年に九州から北陸地方にかけて流行した株に近縁であることが判明した (図4)。

**抗体検査：**血清が採材可能であった発症牛54頭は、2～512倍のAKAV抗体を保有していた。AINOV及びCHUV抗体は検出されなかった。また、未越夏おとり牛の抗体検査では、6～8月にかけて15頭(15%)、8～9月にかけて23頭(23.5%)がAKAV抗体の陽転を示したが、その他アルボウイルスに対しては抗体陽転が認められなかった。

## 考 察

2010年、宮城県内に配置した未越夏おとり牛にAKAV抗体の陽転が認められ、同年9月～翌2011年6月にかけて11年ぶりにアカバネ病が発生した。1998～1999年のアカバネ病発生事例では、8～9月にAKAVの流行が確認され、発生地域は県南部に限局していたが、2010年の発生では、県内全域に感染が拡大した。AKAVの流行が前回と比較して早期(6～8月)に確認され、吸血昆虫の活動最盛期と重なったことが感染拡大の一要因と推察された。遺伝子解析の結果、2010年にはワクチン株と同じgenogroup IIに属する株が流行したことが判明し、ワクチンを確実に接種していれば異常産の発生を抑えることができたと考えられた。実際、異常産はすべてワクチン未接種母牛で認められており、ウイルス流行前における県内のワクチン接種率が26.7%と低かったことも流行規模の拡大に影響したと考えられた。アカバネ病の流行は、かつては5～10年周期とされていたが[10]、近年はその頻度が増加している。そのため、東北地域においても継続的なワクチン接種の助行が必要である。

異常産子牛の病態変化を観察した結果、9～10月分娩の子牛には、脊椎彎曲及び非化膿性脳脊髄炎が多数認められた。11～12月分娩の子牛には、四肢拘縮が多数認められ、重度の矮小筋症が観察された。1月分娩の子牛には、非化膿性脳脊髄炎がほとんど認められず、矮小筋症が全症例に認められたが、11～12月分娩の子牛と比較して病変は軽度であった。また、2～4月分娩の子牛には、水無脳症が多数認められた。これらの脳脊髄炎から、矮小筋症、水無脳症へと移行する病態は、胎子感染による典型的アカバネ病であることを示していた[2, 8]。

9～10月分娩の子牛に非化膿性脳脊髄炎と矮小筋症の両方が確認されたことから、この時期の症例は、脳脊髄炎から矮小筋症主体の病態への移行期であったことが示唆された。また、発生予察調査の結果から、6～8月にAKAVの流行が確認されており、異常産子牛が搬入され始めた9月下旬以前からすでに流産などのAKAVによる被害が始まっていたと推察された。

AKAV遺伝子検出部位の推移を調査した結果、AKAV遺伝子は、非化膿性脳脊髄炎及び脊椎彎曲が主病変であ

った9～10月分娩の子牛全頭のCNS組織から検出された。中脳、小脳及び大脳と比較して、延髄及び脊髄の検出率が高かった。その後時間の経過に伴ってすべての部位で検出率は減少を示したが、ウイルスの流行期から4カ月経過したと考えられる1月初旬分娩の子牛からも検出された。一方、AKAV抗原は9月分娩の子牛1例にのみわずかに認められた程度で、いずれの症例からもウイルスは分離されなかった。このように胎子感染型のアカバネ病は、ウイルス感染から異常産子牛が分娩されるまで時間が経過してしまうため、流行初期に多くみられる流産胎子を除いて抗原検出やウイルス分離による診断が困難な場合がある。したがって、異常子牛においては病理学的検査や初乳未摂取血清中の抗体検出が診断の基本となっている。今回の結果から、非化膿性炎症像が比較的長期に渡って確認される延髄及び脊髄を遺伝子検査に供することで、診断精度を上げることが可能と考えられた。また、感染症以外の原因による異常産の発生や初乳摂取により診断困難な事例もあり得るため、発生予察調査によるウイルスの流行監視を継続し、疫学情報を把握していくことがアカバネ病の対策上不可欠である。

一方、2010年には生後感染症例は認められなかったが、genogroup IIに属するAKAVでも、子牛の脳脊髄炎の原因となることが報告されている[7, 8]。今後異常産のみならず、神経性疾患についてもアカバネ病を疑い、対応していく必要がある。

稿を終えるにあたり、検出されたAKAV遺伝子の情報を提供していただいた岩手県中央家畜保健衛生所の八重樫岳司主任獣医師、山形県中央家畜保健衛生所の平野かおり獣医師、沖縄県家畜衛生試験場の丹羽 毅研究員に深謝する。

## 引用文献

- [1] 山川 睦：アカバネウイルスによる牛の脳脊髄炎，家畜診療，56，141-147 (2009)
- [2] 稲葉右二：牛病学，清水高正編，第2版，182-188，近代出版，東京 (1988)
- [3] 平田美樹，後藤介俊，池田省吾，濱田忠子，有川恵理，藏園光輝，梁瀬 徹，山川 睦：鹿児島県で発生した若齢牛の非化膿性脳脊髄炎，日獣会誌，61，771-776 (2008)
- [4] Kamata H, Inai K, Maeda K, Nishimura T, Arita S, Tsuda T, Sato M : Encephalomyelitis of cattle caused by Akabane virus in southern Japan in 2006, J Comp Pathol, 140, 187-193 (2009)
- [5] Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Kato T, Tanaka S, Tsutsui T, Imada T, Yamakawa M : Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan, BMC Vet Res, 4, 20 (2008)
- [6] Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Yoshida K, Tsuda T : Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates, Virus Res. 130,

- 162-171 (2007)
- [7] 三竹博道, 生水誠一, 武田佳絵, 加藤信正, 田中省吾, 梁瀬 徹, 加藤友子, 山川 陸: アカバネウイルス genogroup II による育成牛の非化膿性脳脊髄炎, 日獣会誌, 64, 140-144 (2011)
- [8] 富田啓介, 加茂前仁弥, 中条正樹, 三宅由利子, 小浜 菜美子, 浦本京也: 兵庫県中部におけるアカバネウイルスによる子牛の非化膿性脳脊髄炎と先天性奇形を伴う異常産の発生, 日獣会誌, 64, 781-786 (2011)
- [9] Akashi H, Onuma S, Nagano H, Ohta M, Fukutomi T: Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction, *Arch Virol*, 144, 2101-2109 (1999)
- [10] 福富豊子, 長井 誠, 奥田宏健, 明石博臣, 秦 守男, 萱原佳美, 秦野好博: 岡山県で分離されたアカバネウイルスの抗原性と遺伝子解析, 日獣会誌, 57, 101-105 (2004)

---

Pathological Feature of Akabane Disease Occurring in Miyagi Prefecture,  
and Differences in Parts of the Viral Gene Detected  
in Affected Calves Born in Different Periods

Hironori TAKAMORI \*†, Masahiro HINO, Koji TAKAHASHI, Tamaki TOYOSHIMA,  
Yuriko TAKEDA, Yasushi TAKANO, Shogo TANAKA and Makoto YAMAKAWA

\* *Sendai Livestock Hygiene Service Center, 3-11-22 Anyouji, Miyagino-ku, Sendai, 983-0832, Japan*

SUMMARY

An outbreak of Akabane virus (AKAV) was observed in the Tohoku area, including Miyagi prefecture, in 2010. Sixty anomaly calves infected with AKAV were provided for pathological examination and for detection of the viral gene from their central nervous systems. Non-suppurative encephalomyelitis and spinal curvature were observed in 14 of 15 calves between September and October 2010. Serious muscular atrophy was found in 22 calves between November and December 2010. Hydranencephaly was observed in 10 of 12 calves between February and April 2011. A slight presence of AKAV antigens was detected in a glial cell in the cervical spinal cord of a calf born in September 2010. The AKAV gene was detected in the midbrain, the medulla oblongata, and in several parts of the spinal cords of calves born in or before December 2010, but was not detected in calves born from February 2011. AKAV was not isolated from calves born in any period. The present study showed that RT-nested PCR analysis of the midbrain, medulla oblongata, and spinal cord could detect the viral gene for long periods, and is imperative in diagnosing the disease.

— Key words : Akabane viral gene, hydranencephaly, medulla oblongata, muscular atrophy, spine.

† *Correspondence to : Hironori TAKAMORI (Sendai Livestock Hygiene Service Center)*

*3-11-22 Anyouji, Miyagino-ku, Sendai, 983-0832, Japan*

*TEL 022-257-0921 FAX 022-295-0984 E-mail : takamori-hi742@pref.miyagi.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 39 ~ 44 (2013)*